

平成23年度福井大学研究育成経費「競争的資金獲得を目指す研究」 酸化ストレス応答における転写調節因子 Id の役割

研究代表者：黒岡 尚徳（医学部・准教授）

概 要	酸化ストレスは、細胞傷害や細胞死を引き起こす一方で、様々なシグナルを活性化し、細胞の分化や増殖に重要な働きをしている。また、酸化還元（レドックス）反応の制御破綻は、細胞の腫瘍化と密接に関連していると考えられるが、その分子基盤はよくわかっていない。bHLH 型転写因子の機能阻害因子であり、発癌との関連が指摘されている転写調節因子 Id は、酸化ストレスによってホモ二量体～多量体を形成するが、最近、発癌関連分子（bZip 型転写因子 ATF3 及び p53）と酸化ストレス依存的に結合することを見出した。本研究でさらに解析を行い、Id と ATF3 や p53 の結合には Id の多量体化が重要であること、そして Id1 は、酸化ストレスによる ATF3 のホモ二量体化を阻害し、p53 の DNA 結合領域と相互作用することなどを明らかにし、Id による細胞癌化の一因となる可能性を示した。
関連キーワード	酸化ストレス、レドックス、Id、ATF3、p53

研究の背景および目的

酸化ストレスは、DNA やタンパク質・脂質などの生体高分子を損傷し、細胞傷害や細胞死を引き起こす一方で、生体内で様々なシグナルを活性化（または不活性化）し、細胞の分化や増殖に重要な働きをすることが近年示されている。また発癌過程における酸化ストレスは、生じる時期や場所に応じて適切な細胞死を誘導する点で正常な分化に必須であり、さらに、酸化ストレスに応答して起きる酸化還元（レドックス）反応の制御破綻は、細胞の腫瘍化に密接に関連していると予想され、いくつかの癌細胞で実際に酸化ストレスの亢進が報告されている。従って、レドックス反応制御の分子基盤や、制御を受ける分子の実体を明らかにすることは、細胞の分化や増殖だけでなく、発癌の分子機構を理解するのに不可欠であると考えられる。生体内においてレドックス制御を受け、レドックスシグナルを中継する代表的な分子として遺伝子発現を調節する転写因子が挙げられるが、これまでの解析は Nrf2 などの一部の分子を中心に、全体像の解明には至っていない。

代表者はこれまで、bHLH 型転写因子の機能を阻害し、細胞の分化抑制及び増殖促進作用を示す転写調節因子 Id の解析を行い、その活性（主に細胞内局在）制御機構について明らかにしてきた（Kurooka and Yokota, J Biol Chem, 2005, Makita, Kurooka et al, FEBS Lett, 2006）。一方で Id は、腫瘍化した細胞や組織の多くで発現の亢

進が報告されており、発癌との関連が指摘されているものの（Fong et al, Trends Mol Med, 2004）、その分子機構についてはよくわかっていない。

Id 分子は、他の bHLH 型転写因子とヘテロ二量体を形成し、ホモ二量体は形成しないものと従来考えられていたが、細胞内では酸化ストレス刺激（過酸化水素水処理）により、ホモ二量体～多量体を形成することが示された（第33回日本分子生物学会年会／第83回日本生化学会大会合同大会「酸化ストレスにより形成される HLH タンパク質の分子間ジスルフィド結合」）。形成されたホモ二量体～多量体は、還元剤の処理で単量体に戻ることから、システイン残基を介したジスルフィド結合が、Id 分子間で形成されることがわかった。このことは、酸化ストレス応答において Id が何らかの働きをしていることを示唆するものである。

本研究では、レドックス制御を受けた Id 分子が、レドックスシグナルが関与する生体内の様々な事象において、どのような役割を果たすのか明らかにすることを目的とする。代表者は最近、Id が bHLH 型転写因子以外に、酸化ストレスに依存して、発癌に関与する分子（bZip 型転写因子 ATF3、及び癌抑制タンパク質 p53）に結合することを見出したことから、これらについての解析を行った。本研究により、Id の発癌への関与が分子レベルで明らかになると予想され、Id を標的とした癌治療につながると期待される。

研究の内容および成果

(1) 酸化ストレスによる Id と ATF3 の結合

HEK293T 細胞において、3×FLAG-Id1~Id3、及び GAL4-ATF3 を一過性に発現させた後、回収した細胞抽出液を用いて、FLAG 抗体による免疫沈降を行った。その結果、Id1~Id3 ともに酸化スト

レスに依存して ATF3 と結合することが示されたが、他の bZip 型転写因子で、内在性に発現する ATF2 とは結合しないことが明らかになった（図1）。また酸化ストレス刺激に伴って、細胞内における様々なリン酸化酵素が活性化することから、

種々の阻害剤を用いて Id1 と ATF3 の結合に与える影響について検討したが、いずれも顕著な変動はみられなかった。一方で、マウス Id1 は5つのシステイン残基を持つが、セリンに置換した変異体と ATF3 の結合を調べたところ、酸化ストレスによる Id1 のホモ多量体形成能と相関が認められた。Id1 と ATF3 の分子間には、ジスルフィド結合が生じないことから、酸化ストレスによってジスルフィド結合を介して形成された Id1 のホモ多量体が ATF3 に結合するものと推測される。さらに、酸化ストレスは ATF3 のホモ二量体形成を促進するが、Id1 は、この二量体化を有意に阻害することが判明した。ATF3 は、様々な刺激によって発現が誘導される転写因子であり、炎症反応の抑制といった免疫系における作用以外に、細胞の増殖抑制や、細胞死誘導活性を示し、癌抑制タンパク質として機能することが知られている。このことから、酸化ストレスによる Id と ATF3 の結合が、ATF3 分子の機能低下を引き起こし、細胞の癌化の一因となる可能性が考えられる。

(2) 酸化ストレスによる Id と p53 の結合

HEK293T 細胞において、3×FLAG-Id1~Id3、及び HA-p53 を一過性に発現させた後、ATF3 の場合と同様に免疫沈降を行った。その結果、Id1~Id3 とともに酸化ストレスに依存して p53 との結合が増強されることが明らかになった (図2)。一方で、bHLH 型転写因子 E タンパク質は、酸化ストレス刺激による p53 との結合が認められなかったが、MyoD は p53 と結合することが示された。また、Id1 のシステイン変異体と p53 との結合について検討した結果、やはり酸化ストレスによる Id1 のホモ多量体形成能と相関があることがわかった。さらに Id1 は、p53 の中央に位置する DNA 結合領域と相互作用することが判明し、その活性を (おそらく負に) 制御すると予想されることから、酸化ストレスによる Id と p53 の結合が、細胞の癌化の一因となる可能性が考えられる。

(3) 酸化ストレスによる Id と E タンパク質の結合

Id と E タンパク質の結合に及ぼす酸化ストレスの効果を調べたところ、両者の間でジスルフィド結合が形成されることが判明した。しかし、ジスルフィド結合を形成しない変異体でも結合の強さは変わらないことから、Id と E タンパク質の結合には、酸化ストレスは影響しないと考えられる。

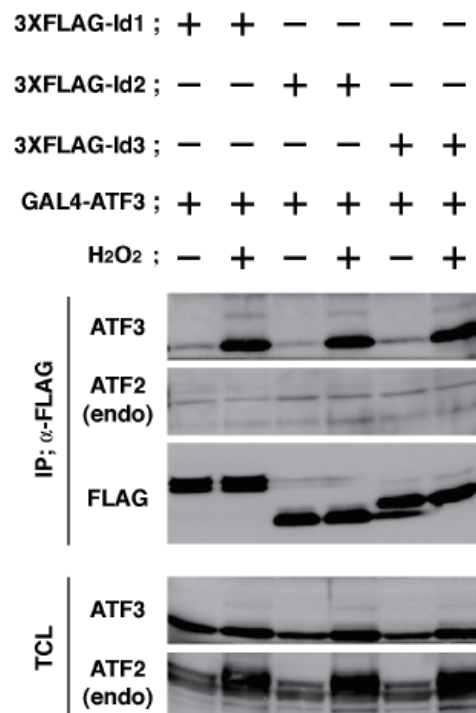


図1. Id と ATF3 の酸化ストレス依存的結合

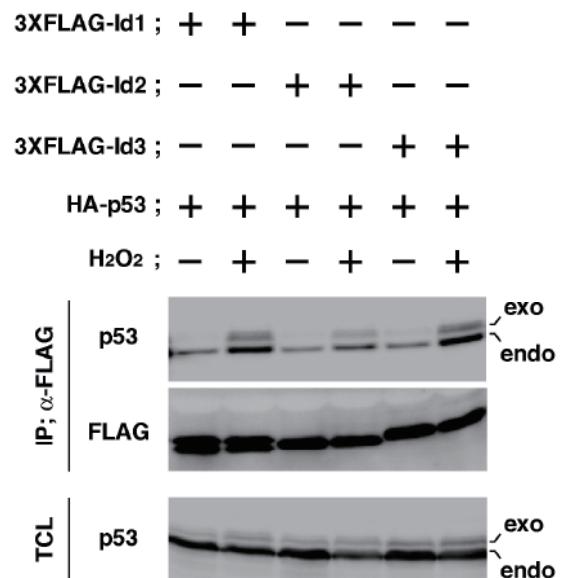


図2. Id と p53 の酸化ストレス依存的結合

本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

「主な発表論文等」

Hisanori Kurooka, Takeshi Nakahiro, Kentaro Mori, Kazuo Sano, and Yoshifumi Yokota
BMP signaling is responsible for serum-induced Id2 expression.
Biochem. Biophys. Res. Commun., in press.

「特記事項」

特になし

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

日本学術振興会・科研費補助金・挑戦的萌芽・H24~26・「HLH タンパク質 Id による酸化ストレス応答制御と発癌分子機構の解析」・代表・申請中